(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年12月5日(05.12.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/230614 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/53 (2006.01)　*C12N 15/52* (2006.01)
C12M 1/40 (2006.01)　*C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)　*C12Q 1/32* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)　*C07K 5/10* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)　*C07K 7/06* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)　*C07K 7/08* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2019/020777

(22) 国際出願日：　2019年5月24日(24.05.2019)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-102829　2018年5月29日(29.05.2018)　JP

(71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (**AMANO ENZYME INC.**) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦一丁目２番７号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 石原 聡 (**ISHIHARA Satoru**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザー丁目６番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 西尾 享一 (**NISHIO Kyoichi**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザー丁目６番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). ルッツ ステファン (**LUTZ Stefan**); 30084 ジョージア州タッカー、モントリオール通り １８２８ Georgia (US).

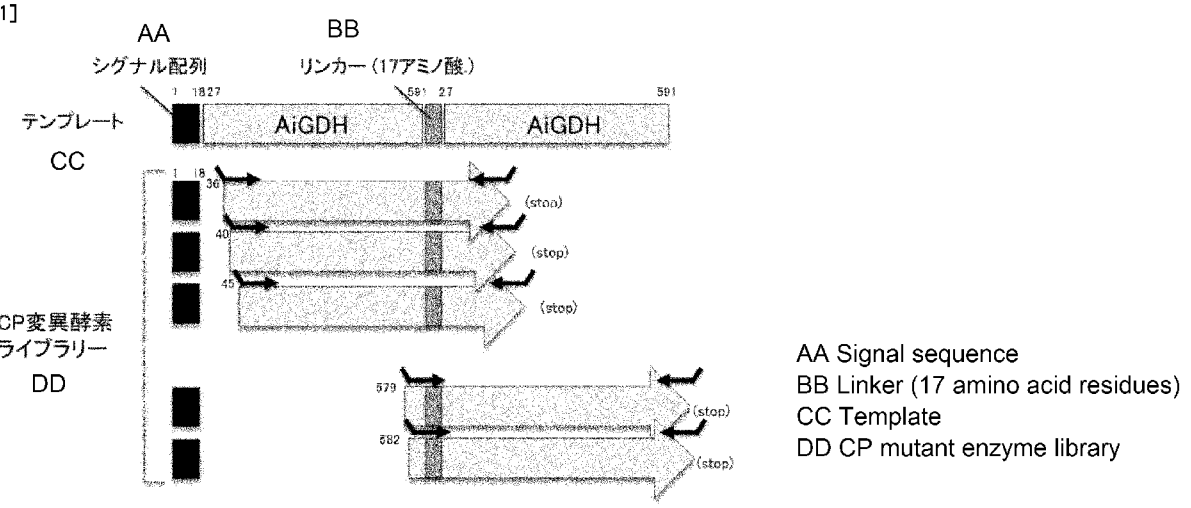
(74) 代理人: 萩野 幹治 (**HAGINO Mikiharu**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ１丁目１番地 Gifu (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) **Title:** IMPROVEMENT OF GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称： グルコースデヒドロゲナーゼの改良

[図1]



AA Signal sequence
BB Linker (17 amino acid residues)
CC Template
DD CP mutant enzyme library

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a flavin adenine dinucleotide-dependent glucose dehydrogenase having further improved substrate specificity and/or low-temperature reactivity and having higher practically value. Disclosed is a flavin adenine dinucleotide-dependent glucose dehydrogenase having reduced xylose reactivity, which is produced utilizing a circular permutation (CP) mutation.

(57) 要約：基質特異性及び／又は低温反応性が更に改善された、より実用的価値が高いフラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコースデヒドロゲナーゼを提供することを課題とする。Ｃｉｒｃｕｌａｒ Ｐｅｒｍｕｔａｔｉｏｎ（ＣＰ）変異を利用して得られた、キシロース反応性が低下したフラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコースデヒドロゲナーゼが開示される。

WO 2019/230614 A1

[続葉有]

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： グルコースデヒドロゲナーゼの改良

技術分野

[0001] 本発明はグルコースデヒドロゲナーゼ（グルコース脱水素酵素）に関する。詳しくは、特性（基質特異性、低温反応性）が改善されたフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（E.C.1.1.5.9）及びその遺伝子等に関する。本出願は、２０１８年５月２９日に出願された日本国特許出願第２０１８－１０２８２９号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

背景技術

[0002] 糖尿病患者は年々増加しており、糖尿病患者、特にインスリン依存性の患者は血糖値を日常的に監視し血糖をコントロールする必要がある。近年、酵素を用いてリアルタイムで簡便にかつ正確に測定できる自己血糖測定器で糖尿病患者の血糖値をチェック出来るようになった。グルコースセンサ（例えば、自己血糖測定器に使用されるセンサ）用として、グルコースオキシダーゼ（E.C.1.1.3.4）、PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（E.C.1.1.5.2）（例えば特許文献１～３を参照）が開発されたが、酸素反応性、マルトース、ガラクトースへの反応性が問題となった。この問題を解決すべく、FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（以下、「FAD-GDH」と略称する）が開発された（例えば特許文献４、５、非特許文献１～４を参照）。

[0003] 一般に、糖尿病判定検査時には、経口グルコース負荷試験だけでなく、経口キシロース負荷試験、経静脈キシロース負荷試験が実施される。FAD-GDHは概してキシロースへ反応することが知られており、FAD-GDHを用いた場合、上記負荷試験時に血糖値へ影響することが問題となる。一方、FAD-GDHを利用した血糖測定器の測定精度は環境温度に影響を受けることが知られている。また、特に重要な問題として、センサに使用するFAD-GDHの反応性が低下する低温環境で測定した場合、血糖値が低い領域において実際の血糖値よりも測定

値が低くなることが指摘されている。本出願人は、これらの問題に対する解決策として、キシロースへの反応性が低い、即ち基質特異性に優れたFAD-GDH及びその改良型酵素を報告している（特許文献６、７）。尚、特許文献８には、キシロースに対する反応性が低いFAD-GDHが報告されているが、グルコースセンサに応用した場合に特に重要となるpH安定性等の特性は明らかにされておらず、その実用的価値は不明である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２０００－３５０５８８号公報

特許文献2：特開２００１－１９７８８８号公報

特許文献3：特開２００１－３４６５８７号公報

特許文献4：国際公開第２００４／０５８９５８号パンフレット

特許文献5：国際公開第２００７／１３９０１３号パンフレット

特許文献6：国際公開第２０１７／０７７９２４号パンフレット

特許文献7：国際公開第２０１８／０６２１０３号パンフレット

特許文献8：国際公開第２０１５／０６０１５０号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Studies on the glucose dehydrogenase of Aspergillus oryzae. I. Induction of its synthesis by p-benzoquinone and hydroquinone, T.C. Bak, and R. Sato, Biochim. Biophys. Acta, 139, 265-276 (1967).

非特許文献2：Studies on the glucose dehydrogenase of Aspergillus oryzae. II. Purification and physical and chemical properties, T.C. Bak, Biochim. Biophys. Acta, 139, 277-293 (1967).

非特許文献3：Studies on the glucose dehydrogenase of Aspergillus oryzae. III. General enzymatic properties, T.C. Bak, Biochim. Biophys. Acta, 146, 317-327 (1967).

非特許文献4：Studies on the glucose dehydrogenase of Aspergillus oryzae. IV. Histidyl residue as an active site, T.C. Bak, and R. Sato, Bi

ochim. Biophys. Acta, 146, 328-335 (1967).

非特許文献5：Qian, Z. and Lutz S. (2005). J Am Chem Soc 127(39): 13466-13467.

非特許文献6：Daugherty, A. B., et al. (2013). J Am Chem Soc 135(38): 14425-14432.

非特許文献7：Daugherty, A. B., et al. (2015). ACS Catal 5(2): 892-899.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上記の通り、キシロースへの反応性が低いFAD-GDHが開発されているが、基質特異性は未だ改善の余地がある。低温反応性についても同様であり、更なる改善が望まれる。そこで本発明は、基質特異性及び／又は低温反応性が更に改善された、より実用的価値が高いFAD-GDHを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決すべく検討を進める中で本発明者らは、Circular Permutation（CP）変異に着眼し、先の特許出願（特許文献６、７）で報告したFAD-GDHの改良を試みた。CP変異はタンパク質の構造を維持しつつ、標的タンパク質のN末端およびC末端を変える手法である（非特許文献５）。この方法は活性部位の構造を大きく変化させることなく、酵素活性や基質特異性を改変できる可能性があることが報告されている（非特許文献６、７）。

[0008] 設計した変異酵素の網羅的なスクリーニング及び評価の末、基質特異性が向上した複数の変異酵素が同定された。これらの変異酵素の低温反応性を調べたところ、低温反応性の向上も認められた。このように本発明者らは、特に血糖測定用グルコースセンサへの利用に適した、実用性の高いFAD-GDHの創出に成功した。以下の発明は当該成果に基づく。

［１］配列番号４のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第１配列と、配列番号５のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第２配列がペプチドリ

ンカーを介して連結した一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第３配列と、配列番号７のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第４配列がペプチドリンカーを介して連結した一次構造を有し、配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型酵素に比較して、D-キシロースに対する反応性が低い、及び／又はグルコースデヒドロゲナーゼ活性の低温反応性が向上している、グルコースデヒドロゲナーゼ。

［２］前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が80%以上である、［１］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［３］前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が85%以上である、［１］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［４］前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が90%以上である、［１］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［５］配列番号４のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列と、配列番号５のアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造を有する、［１］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［６］配列番号６のアミノ酸配列の125番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列の160番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列の144番チロシンがシステインに置換され、且つ184番グリシンがシステインに置換されたたア

ミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造を有する、［１］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［７］前記ペプチドリンカーを構成するアミノ酸の数が５～３０である、［１］～［６］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［８］前記ペプチドリンカーがESSSGTSSSSGTSESSS（配列番号２３）又はGTSSS（配列番号２５）である、［７］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［９］(a)配列番号８のアミノ酸配列、

(b)配列番号８のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

(c)配列番号９のアミノ酸配列、

(d)配列番号９のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

(e)配列番号３２のアミノ酸配列、又は

(f)配列番号３２のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

を有し、配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型酵素に比較して、D-キシロースに対する反応性が低い、及び／又はグルコースデヒドロゲナーゼ活性の低温安定性が向上している、グルコースデヒドロゲナーゼ。

［１０］(b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が80%以上である、［９］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［１１］(b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が85%以上である、［９］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［１２］(b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が90%以上である、［９］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［１３］配列番号８のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列、又は配列番号９のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列からなる、［９］に記載のグルコースデヒドロゲ

ナーゼ。

［１４］配列番号３６又は３７のアミノ酸配列からなる、［９］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［１５］D-グルコースに対する反応性を100％としたときのD-キシロースに対する反応性が8％以下である、［１］～［１４］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

［１６］［１］～［１５］のいずれかのグルコースデヒドロゲナーゼをコードするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

［１７］以下の(A)～(C)からなる群より選択されるいずれかのDNAからなる、［１４］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子：

(A)配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードするDNA；

(B)配列番号１０～１３、３８～４３のいずれかの塩基配列からなるDNA；

(C)配列番号１０～１３、３８～４３のいずれかの塩基配列と等価な塩基配列を有し、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

［１８］［１６］又は［１７］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換えDNA。

［１９］［１８］に記載の組換えDNAを保有する微生物。

［２０］以下のステップ(1)～(3)を含む、グルコースデヒドロゲナーゼの調製法：

(1)［１６］又は［１７］に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を用意するステップ；

(2)前記遺伝子を発現させるステップ；及び

(3)発現産物を回収するステップ。

［２１］［１］～［１５］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを用いて試料中のグルコースを測定することを特徴とする、グルコース測定法。

［２２］［１］～［１５］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用試薬。

［２３］［２２］に記載のグルコース測定用試薬を含む、グルコース測定用キット。

［２４］［１］～［１５］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコースセンサ。

［２５］［１］～［１５］のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有する酵素剤。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]CP変異酵素ライブラリーの構築方法。

[図2]CP変異酵素の低温反応性。キシロース反応性が低下した二つのCP変異酵素（CP-L184、CP-V229）の低温反応性を野生型酵素と比較した。50℃の活性を100%とした相対活性で評価した。

発明を実施するための形態

[0010] １．用語

本明細書において用語「単離された」は「精製された」と交換可能に使用される。用語「単離された」は、人為的操作が介在することなく産生される物の場合、天然の状態、即ち、自然界において存在している状態のものと区別するために使用され、人為的操作が介在して生産される物の場合、単離工程又は精製工程を経ていないものと区別するために使用される。前者の場合、単離するという人為的操作によって、天然の状態とは異なる状態である「単離された状態」となり、単離されたものは天然物自体と明確且つ決定的に相違する。一方、後者の場合、典型的には、単離工程又は精製工程によって不純物が除去され又はその量が低減され、純度が高まる。単離された酵素の純度は特に限定されない。但し、純度の高いことが要求される用途への適用が予定されるのであれば、単離された酵素の純度は高いことが好ましい。

[0011] 用語「改変型グルコースデヒドロゲナーゼ」とは、既存のグルコースデヒドロゲナーゼ（典型的には野生型酵素）が変異ないし改変された酵素である

。用語「改変型グルコースデヒドロゲナーゼ」は用語「変異酵素」と交換可能に用いられる。また、本明細書中ではグルコースデヒドロゲナーゼを「GDH」と略称することがある。

[0012] ２．改変型グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）

本発明の第１の局面は改変型GDH（以下、「本酵素」とも呼ぶ）に関する。本酵素はCP変異を応用した検討によって見出された特徴的な構造を備える。具体的には、本酵素は、野生型酵素のN末端側領域に対応する配列（「N末端側配列」と呼ぶ）と同C末端側領域に対応する配列（「C末端側配列」と呼ぶ）がペプチドリンカーを介して連結した一次構造を備える。本酵素ではN末端からC末端に向かってN末端側配列、ペプチドリンカー及びC末端側配列がこの順序で配置されることになる。

[0013] 本酵素は野生型酵素よりも優れた特性を示す。ここでの特性は基質特異性及び／又は低温反応性である。典型的には、本酵素にはこれら二つの特性の向上が認められる。基質特異性が向上しているとD-グルコースに対して選択的に作用し、配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型酵素に比較して、D-キシロースに対する反応性は低くなる。基質特異性が向上した本酵素では、D-グルコースに対する反応性を100%としたときのD-キシロースに対する反応性が、好ましくは8%以下であり、更に好ましくは7%以下であり、より一層好ましくは6%以下である。尚、基質特異性が向上した本酵素では、典型的には、マルトースやD-ガラクトースなどに対する反応性も野生型酵素よりも低くなる。

[0014] 優れた基質特異性を有する本酵素は、試料中のグルコース量を正確に測定するための酵素として好ましい。即ち、本酵素によれば試料中にD-キシロースやマルトース或いはD-ガラクトースなどの夾雑物が存在していた場合であっても目的のグルコース量をより正確に測定することが可能である。従って本酵素は、試料中にこのような夾雑物の存在が予想又は懸念される用途（典型的には血液中のグルコース量の測定）に適したものであるといえ、しかも当該用途も含め様々な用途に適用可能であること、即ち汎用性が高いともい

える。尚、本酵素の反応性及び基質特異性は、後述の実施例に示す方法で測定・評価することができる。

[0015] 一方、低温反応性の向上は、例えば、50℃での活性に対する20℃での活性（50℃の活性を基準とした20℃での相対活性）に基づき評価できる。低温反応性が向上していると、当該相対活性は、本酵素の方が野生型酵素よりも高くなる。本酵素の当該相対活性は、例えば、野生型酵素の2倍～5倍である。低温反応性が向上した本酵素は、低温環境下での利用が想定される用途（典型的には血糖測定器用のグルコースセンサ）に適する。尚、本発明の特性の理解及び野生型酵素との比較を容易にするため、本明細書における低温は「15℃～25℃」とする。

[0016] 本酵素の第１態様ではN末端側配列が配列番号４のアミノ酸配列からなり、C末端側配列が配列番号５のアミノ酸配列からなる。この態様は変異酵素CP-L184（後述の実施例を参照）に対応する。一方、本発明の第２態様ではN末端側配列が配列番号６のアミノ酸配列からなり、C末端側配列が配列番号７のアミノ酸配列からなる。この態様は変異酵素CP-V229（後述の実施例を参照）に対応する。尚、説明の便宜上、第１態様のN末端側配列及びC末端側配列をそれぞれ第１配列及び第２配列と呼び、第２態様のN末端側配列及びC末端側配列をそれぞれ第３配列及び第４配列と呼ぶ。

[0017] ところで、一般に、あるタンパク質のアミノ酸配列の一部を変異させた場合において変異後のタンパク質が変異前のタンパク質と同等の機能を有することがある。即ちアミノ酸配列の変異がタンパク質の機能に対して実質的な影響を与えず、タンパク質の機能が変異前後において維持されることがある。この技術常識を考慮すれば、上記の本酵素（第１態様又は第２態様）と比較した場合に、アミノ酸配列の僅かな相違が認められるものの、特性に実質的な差が認められないものは、上記本酵素と実質同一の酵素とみなすことができる。ここでの「アミノ酸配列の僅かな相違」とは、典型的には、アミノ酸配列を構成する１～数十個（上限は例えば２０個、３０個、５０個、９０個）、好ましくは１～数個（上限は例えば３個、５個、７個、１０個）のア

ミノ酸の欠失、置換、若しくは１～数十個（上限は例えば２０個、３０個、５０個、９０個）、好ましくは１～数個（上限は例えば３個、５個、７個、１０個）のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることをいう。

[0018] 第１態様の場合の実質同一の酵素は、第１配列に対応する配列、即ち、配列番号４のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる配列（「第１相同配列」と呼ぶ）と、第２配列に対応する配列、即ち、配列番号５のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる配列（「第２相同配列」と呼ぶ）が、ペプチドリンカーを介して連結した一次構造を備える。尚、第１相同配列と第２相同配列のいずれか片方が、同一性の基準となる配列（即ち第１配列又は第２配列）と100%同一であってもよい。

[0019] 第２態様の場合も同様に、実質同一の酵素は、第３配列に対応する配列、即ち、配列番号６のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる配列（「第３相同配列」と呼ぶ）と、第４配列に対応する配列、即ち、配列番号７のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる配列（「第４相同配列」と呼ぶ）が、ペプチドリンカーを介して連結した一次構造を備える。尚、第３相同配列と第４相同配列のいずれか片方が、同一性の基準となる配列（即ち第３配列又は第４配列）と100%同一であってもよい。

[0020] 「実質同一の酵素」における相同配列（第１相同配列、第２相同配列、第３相同配列、第４相同配列）と、基準となる変異酵素の配列（第１相同配列に対する第１配列、第２相同配列に対する第２配列、第３相同配列に対する第３配列、第４相同配列に対する第４配列）との同一性（%）は、好ましくは80%以上であり、更に好ましくは85%以上、更に更に好ましくは90%以上であり、より一層好ましくは95%以上であり、特に好ましくは97%以上であり、最も好ましくは99%以上である。尚、アミノ酸配列の相違は複数の位置で生じていてもよい。

[0021] 「アミノ酸配列の僅かな相違」は、好ましくは保存的アミノ酸置換により生じている。「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性

質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0022] ところで、二つのアミノ酸配列又は二つの核酸（以下、これらを含む用語として「二つの配列」を使用する）の同一性（%）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基又はヌクレオチド）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性（%）＝同一位置の数／位置の総数 × 100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

[0023] 二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。このようなアルゴリズムは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に記載のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。本発明の核酸分子に等価なヌクレオチド配列を得るには

例えば、NBLASTプログラムでscore = 100、wordlength = 12としてBLASTヌクレオチド検索を行えばよい。本酵素に等価なアミノ酸配列を得るには例えば、XBLASTプログラムでscore = 50、wordlength = 3としてBLASTポリペプチド検索を行えばよい。比較のためのギャップアライメントを得るためには、Altschulら（1997）Amino Acids Research 25(17):3389-3402に記載のGapped BLASTが利用可能である。BLASTおよびGapped BLASTを利用する場合は、対応するプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。詳しくはhttp://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。配列の比較に利用可能な他の数学的アルゴリズムの例としては、MyersおよびMiller（1988）Comput Appl Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、例えばGENESTREAMネットワークサーバー（IGH Montpellier、フランス）またはISRECサーバーで利用可能なALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合は例えば、PAM120残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ＝12、ギャップペナルティ＝4とすることができる。

[0024] 二つのアミノ酸配列の同一性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスを使用し、ギャップ加重＝12、10、8、6、又は4、ギャップ長加重＝2、3、又は4として決定することができる。また、二つの核酸配列の相同度を、GCGソフトウェアパッケージ（http://www.gcg.comで利用可能）のGAPプログラムを用いて、ギャップ加重＝50、ギャップ長加重＝3として決定することができる。

[0025] 本酵素が、より大きいタンパク質（例えば融合タンパク質）の一部であってもよい。融合タンパク質において付加される配列としては、例えば、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保する付加配列等が挙げられる。

[0026] 本酵素の構成要素となる「ペプチドリンカー」とは、直鎖状にアミノ酸が連結したペプチドからなるリンカーである。ペプチドリンカーを構成するアミノ酸は特に限定されない。好ましくは、サイズの小さいアミノ酸（例えば

グリシン（G）、セリン（S））が用いられるが、スレオニン（T）、グルタミン酸（E）等を用いてペプチドリンカーを構成してもよい。グリシンやセリン等、サイズの小さいアミノ酸を用いてペプチドリンカーを構成すると、ペプチドリンカーの動きが制限されにくくなり、立体構造形成への影響が少なくなる。

[0027] 好ましいペプチドリンカー設計方針の一つは、野生型酵素のアミノ酸配列の一部を利用又は模倣すること、即ち、野生型酵素のアミノ酸配列の一部をそのまま又は部分的に変更（構成アミノ酸の変更、片側若しくは両側又は途中にアミノ酸残基を追加することなど）したものをペプチドリンカーに使用することである。この方針で設計したペプチドリンカーの具体例はESSSGTSSSSGTSESSS（配列番号２３）であり、このペプチドリンカーが所望の機能を発揮することが確認されている（後述の実施例を参照）。このペプチドリンカーの他、ペプチドリンカーの具体例としてGTSSSS（配列番号１６）、GTEESSS（配列番号１７）、SSSGTSSSS（配列番号１８）、GTSQPESSS（配列番号１９）、GTSWAQPESSS（配列番号２０）、GTSAPWAQPESSS（配列番号２１）、YLTDTSPTEFESSS（配列番号２２）、ESSSGTSSSSGTSESSS（配列番号２３）、YVKGSDKNVKPVKGESSS（配列番号２４）、GTSSS（配列番号２５）、GTSSSSGTS（配列番号２６）及びGTSSESSSGTSSSSGTSESSS（配列番号２７）を挙げることができる。これらの例が示すように、好ましいリンカー設計方針の例として、G、S及びTのいずれか又はこれらの中の二つ以上を含むようにリンカーを構成すること、並びに、G、S及びTのみでリンカーを構成すること、を挙げることができる。

[0028] ペプチドリンカーの長さ、即ち、構成アミノ酸残基の数は例えば５個～３０個、好ましくは５個～２５個、更に好ましくは５個～２１個である。N末端とC末端の位置関係（配置）を維持するという、CP変異（その構造を維持しつつ、標的タンパク質（酵素）のN末端及びC末端を変える手法）における重要な設計戦略を考慮してペプチドリンカーの長さを決定するとよい。

[0029] 本酵素のアミノ酸配列、即ち、N末端からC末端に向かって、N末端側配列、

ペプチドリンカー及びC末端側配列がこの順序で配置されたアミノ酸配列、の例として以下の(a)～(d)を挙げることができる。

(a)配列番号８のアミノ酸配列

(b)配列番号８のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列

(c)配列番号９のアミノ酸配列

(d)配列番号９のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列

(e)配列番号３２のアミノ酸配列

(f)配列番号３２のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列

[0030] (b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性は、好ましくは80%以上であり、更に好ましくは85%以上、更に更に好ましくは90%以上であり、より一層好ましくは92%以上であり、特に好ましくは95%以上であり、最も好ましくは99%以上である。尚、アミノ酸配列の相違は複数の位置で生じていてもよい。

[0031] ところで、本酵素の元になったGDH（アスペルギルス・イイズカエ（Aspergillus iizukae）No.5453株の産生するGDH）については、低温反応性の改善に有効な変異（アミノ酸置換）が見出されている（ＷＯ　２０１８／０６２１０３号を参照）。この事実に基づき、当該変異を適用した改変型GDHが提供される。この改変型GDHでは、第１配列（第１態様のN末端側配列）として、配列番号４のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列又はその相同配列が用いられ、第３配列（第２態様のN末端側配列）として、配列番号６のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列又はその相同配列が用いられることになり、例えば、配列番号８のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列、又は配列番号９のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列を有することになる。尚、置換対象のアミノ酸残基（配列番号８では173番アミノ酸、配列番号９では128番アミノ酸）は野生型酵素（シグナルペプチド

を含み、配列番号２に示される）の354番アミノ酸に対応する。

[0032] 尚、アスペルギルス・イイズカエ（Aspergillus iizukae）No.5453株はNBRC 8869株と同一株である。NBRC 8869株は独立行政法人製品評価技術基盤機構（NBRC）（〒292-0818　千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８）に保存されており、所定の手続きを経ることによってその分譲を受けることができる。

[0033] 一方、CP変異と併用した場合に耐熱性の向上をもたらすアミノ酸置換を見出すことに成功した（詳細は後述の実施例を参照）。この成果に基づき、当該アミノ酸置換を適用した改変型GDHが提供される。この改変型GDHの一例では、第３配列（第２態様のN末端側配列）として、配列番号６のアミノ酸配列の125番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列又はその相同配列が用いられ、第４配列（第２態様のC末端側配列）として、配列番号７のアミノ酸配列の160番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列又はその相同配列が用いられる。当該改変型GDHの具体例（CP-V229-5aa（S186C/S351C））のアミノ酸配列を配列番号３６に示す。別の例では、第４配列（第２態様のC末端側配列）として、配列番号７のアミノ酸配列の144番チロシンがシステインに置換され、且つ184番グリシンがシステインに置換されたたアミノ酸配列又はその相同配列が用いられる（第３配列は配列番号６のアミノ酸配列又はその相同配列）。当該改変型GDHの具体例（CP-V229-5aa（Y170C/G210C））のアミノ酸配列を配列番号３７に示す。尚、配列番号６のアミノ酸配列の125番アミノ酸（配列番号３６では125番アミノ酸）は野生型酵素（シグナルペプチドを含み、配列番号２に示される。以下も同様）の351番アミノ酸に、配列番号７のアミノ酸配列の160番アミノ酸（配列番号３６では530番アミノ酸）は野生型酵素の186番アミノ酸に、配列番号７のアミノ酸配列の144番アミノ酸（配列番号３７では514番アミノ酸）は野生型酵素の170番アミノ酸に、配列番号７のアミノ酸配列の184番アミノ酸（配列番号３７では570番アミノ酸）は野生型酵素の210番アミノ酸に、それぞれ対応する。尚、後述の実施例に示した通り、CP変異を加えていない野生型酵素（配列番号１）に対しても上記の二組のアミノ酸置換が耐熱性向上に有効であることが示された。この知見に基

づき本願は、野生型酵素（配列番号１）の170番セリンがシステインに置換され（上記のS186Cに対応する）、且つ335番セリンがシステインに置換され（上記S351Cに対応する）、当該二つのアミノ酸置換によって耐熱性が向上した改変型GDHと、野生型酵素（配列番号１）の154番チロシンがシステインに置換され（上記のY170Cに対応する）、且つ194番グリシンがシステインに置換され（上記のG210Cに対応する）、当該二つのアミノ酸置換によって耐熱性が向上した改変型GDHも提供する。

[0034] 本酵素は、遺伝子工学的手法によって容易に調製することができる。例えば、本酵素をコードするDNAで適当な宿主細胞（例えば大腸菌）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。このように組換えタンパク質として本酵素を得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、本酵素をコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本酵素を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0035] ３．改変型GDHをコードする核酸等

本発明の第２の局面は本酵素に関連する核酸を提供する。即ち、本酵素をコードする遺伝子、本酵素をコードする核酸を同定するためのプローブとして用いることができる核酸、本酵素をコードする核酸を増幅又は突然変異等させるためのプライマーとして用いることができる核酸が提供される。

[0036] 本酵素をコードする遺伝子は典型的には本酵素の調製に利用される。本酵素をコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的調製法によれば、より均質な状態の本酵素を得ることが可能である。また、当該方法は大量の本酵素を調製する場合にも好適な方法といえる。尚、本酵素をコードする遺伝子の用途は

本酵素の調製に限られない。例えば、本酵素の作用機構の解明などを目的とした実験用のツールとして、或いは酵素の更なる変異体をデザイン又は作製するためのツールとして、当該核酸を利用することもできる。

[0037] 本明細書において「本酵素をコードする遺伝子」とは、それを発現させた場合に本酵素が得られる核酸のことをいい、本酵素のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸をも含む。また、コドンの縮重も考慮される。

[0038] 本酵素をコードする遺伝子の配列の例を配列番号１０（変異酵素CP-L184をコードする配列。シグナル配列を含まない）、配列番号１１（変異酵素CP-L184をコードする配列。シグナル配列を含む）、配列番号１２（変異酵素CP-V229をコードする配列。シグナル配列を含まない）、配列番号１３（変異酵素CP-V229をコードする配列。シグナル配列を含む）、配列番号３８（変異酵素CP-V229-5aaをコードする配列。シグナル配列を含まない）、配列番号３９（変異酵素CP-V229-5aa)をコードする配列。シグナル配列を含む）、配列番号４０（変異酵素CP-V229-5aa（S186C/S351C)をコードする配列。シグナル配列を含まない）、配列番号４１（変異酵素CP-V229-5aa（S186C/S351C)をコードする配列。シグナル配列を含む）、配列番号４２（変異酵素CP-V229-5aa（Y170C/G210C)をコードする配列。シグナル配列を含まない）、配列番号４３（変異酵素CP-V229-5aa（Y170C/G210C)をコードする配列。シグナル配列を含む）に示す。

[0039] 本発明の核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。

[0040] 本発明の他の態様では、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列と比較した場合にそれがコードするタンパク質の機能は同等であるものの一部において塩基配列が相違する核酸（以下、「等価核酸」ともいう。また、等価核酸を規定する塩基配列を「等価塩基配列」ともいう）が提供される。等価核酸の

例として、本酵素をコードする核酸の塩基配列を基準として１若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、本酵素に特徴的な酵素活性（即ちGDH活性）を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該核酸がコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば2～40塩基、好ましくは2～20塩基、より好ましくは2～10塩基である。

[0041] 等価核酸は、基準となる塩基配列（配列番号１０～１３、３８～４３のいずれかの配列）に対して、例えば70％以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは85%以上、更に更に好ましくは90%以上、より一層好ましくは92%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する。

[0042] 以上のような等価核酸は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13 ,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13 ,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。また、紫外線照射など他の方法によっても等価核酸を得ることができる。

[0043] 本発明の他の態様は、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸に関する。本発明の更に他の態様は、本発明の本酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は99.9%同一な塩基配列を有する核酸を提供する。

[0044] 本発明の更に別の態様は、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列又はその等価塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する核酸に関する。ここでの「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジェントな条件

は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) を参照して設定することができる。ストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いて約42℃～約50℃でインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1% SDSを用いて約65℃～約70℃で洗浄する条件を挙げることができる。更に好ましいストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いる条件を挙げることができる。

[0045] 本発明の更に他の態様は、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列の一部を有する核酸（核酸断片）を提供する。このような核酸断片は、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸などを検出、同定、及び／又は増幅することなどに用いることができる。核酸断片は例えば、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列において連続するヌクレオチド部分（例えば約10～約100塩基長、好ましくは約20～約100塩基長、更に好ましくは約30～約100塩基長）にハイブリダイズする部分を少なくとも含むように設計される。プローブとして利用される場合には核酸断片を標識化することができる。標識化には例えば、蛍光物質、酵素、放射性同元素を用いることができる。

[0046] 本発明の更に他の局面は、本発明の遺伝子（本酵素をコードする遺伝子）を含む組換えDNAに関する。本発明の組換えDNAは例えばベクターの形態で提供される。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいう。

[0047] 使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の

種類を考慮して適当なベクターが選択される。大腸菌を宿主とするベクターとしてはM13ファージ又はその改変体、λファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）等、酵母を宿主とするベクターとしてはpYepSec1、pMFa、pYES2等、昆虫細胞を宿主とするベクターとしてはpAc、pVL等、哺乳類細胞を宿主とするベクターとしてはpCDM8、pMT2PC等、糸状菌を宿主とするベクターとしてはpUC19等を例示することができる。

[0048] 本発明のベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

[0049] 本発明の核酸のベクターへの挿入、選択マーカー遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

[0050] 宿主細胞としては、取り扱いの容易さの点から、大腸菌（エシェリヒア・コリ）、出芽酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）、糸状菌（アスペルギルス・オリゼ）などの微生物を用いることが好ましいが、組換えDNAが複製可能で且つ本酵素の遺伝子が発現可能な宿主細胞であれば利用可能である。大腸菌の例としてT7系プロモーターを利用する場合は大腸菌BL21(DE3)pLysS、そうでない場合は大腸菌JM109を挙げることができる。糸状菌の例としてアスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）RIB40を挙げることができる。また、出芽酵母の例として出芽酵母SHY2、出芽酵母AH22あるいは出芽酵母INVSc1（インビトロジェン社）を挙げることができる。

[0051] 本発明の更に他の局面は、本発明の組換えDNAを保有する微生物（即ち形質転換体）に関する。本発明の微生物は、上記本発明のベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって得ることができる。例えば、塩化カルシウム法（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J.Mol. Biol.)、第53巻、第159頁（1970)）、ハナハン（Hanahan）法（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー、第166巻、第557頁（1983)）、SEM法（ジーン（Gene)、第96巻、第23頁(1990)〕、チャング（Chung）らの方法（プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA、第86巻、第2172頁(1989)）、リン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポーレーション(Potter,H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84,7413-7417(1984))等によって実施することができる。尚、本発明の微生物は、本酵素を生産することに利用することができる。

[0052] ４．改変型GDHの調製法

本発明の更なる局面は本酵素の調製法に関する。本発明の調製法では、本発明者らが取得に成功した改変型GDHを遺伝子工学的手法で調製する。具体的には、まず本酵素をコードする遺伝子を用意する（ステップ(1)）。具体的には、例えば、配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードする核酸を用意する。ここで、「配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードする核酸」は、それを発現させた場合に当該アミノ酸配列を有するポリペプチドが得られる核酸であり、当該アミノ酸配列に対応する塩基配列からなる核酸は勿論のこと、そのような核酸に余分な配列（アミノ酸配列をコードする配列であっても、アミノ酸配列をコードしない配列であってもよい）が付加されていてもよい。また、コドンの縮重も考慮される。「配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードする核酸」は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによ

って、単離された状態に調製することができる。ここで、配列番号８のアミノ酸配列、配列番号９のアミノ酸配列、配列番号３２のアミノ酸配列、配列番号３６のアミノ酸配列及び配列番号３７のアミノ酸配列は、アスペルギルス・イイズカエNo.5453株由来GDHのアミノ酸配列が改変されたものである。従って、アスペルギルス・イイズカエNo.5453株由来GDHをコードする遺伝子（配列番号３の塩基配列）を利用することにより、配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードする核酸（遺伝子）を得ることができる。尚、配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードするDNAの具体例は配列番号１０～１３、３８～４３の塩基配列である。

[0053] ステップ（1)に続いて、用意した遺伝子を発現させる（ステップ(2)）。例えば、まず上記遺伝子を挿入した発現ベクターを用意し、これを用いて宿主細胞を形質転換する。次に、発現産物である変異酵素が産生される条件下で形質転換体を培養する。形質転換体の培養は常法に従えばよい。培地に使用する炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

[0054] 培養温度は培養対象の形質転換体の生育特性や変異型酵素の産生特性などを考慮して設定することができる。好ましくは30℃～40℃の範囲内（より好ましくは37℃付近）で設定することができる。培養時間は、培養対象の形質転換体の生育特性や変異型酵素の産生特性などを考慮して設定することができる。培地のpHは、形質転換体が生育し且つ酵素が産生される範囲内に調製される。好ましくは培地のpHを6.0～9.0程度（好ましくはpH7.0付近）とする。

[0055] 続いて、発現産物（改変型GDH）を回収する（ステップ(3)）。培養後の菌

体を含む培養液をそのまま、或いは濃縮、不純物の除去などを経た後に酵素溶液として利用することもできるが、一般的には培養液又は菌体より発現産物を一旦回収する。発現産物が分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、減圧濃縮、膜濃縮、硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを利用した塩析、メタノールやエタノール又はアセトンなどによる分別沈殿法、透析、加熱処理、等電点処理、ゲルろ過や吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー（例えば、セファデックス（Sephadex）ゲル（GEヘルスケアバイオサイエンス）などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B （GEヘルスケアバイオサイエンス）、オクチルセファロースCL-6B （GEヘルスケアバイオサイエンス）、CMセファロースCL-6B（GEヘルスケアバイオサイエンス））などを組み合わせて分離、精製を行ことにより改変型GDHの精製品を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、培養液をろ過、遠心処理等することによって菌体を採取し、次いで菌体を加圧処理、超音波処理などの機械的方法またはリゾチームなどによる酵素ｄ的方法で破壊した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより改変型GDHの精製品を得ることができる。

[0056] 酵素の精製度は特に限定されないが、例えば比活性が0.1～1000（U/mg）、好ましくは比活性が1～500（U/mg）の状態に精製することができる。また、最終的な形態は液体状であっても固体状（粉体状を含む）であってもよい。

[0057] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いはスプレードライなどにより粉末化して提供することも可能である。その際、精製酵素を予めリン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解させておいてもよい。好ましくは、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液を使用することができる。尚、ここでGOODの緩衝液としてはPIPES、MES又はMOPSが挙げられる。

[0058] 通常は、以上のように適当な宿主－ベクター系を利用して遺伝子の発現～

発現産物（改変型GDH）の回収を行うが、無細胞合成系を利用することにしてもよい。ここで、「無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）」とは、生細胞を用いるのではく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞合成系では一般に、細胞破砕液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0059] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する３種類の開始因子、３種類の伸長因子、終結に関与する４種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる２０種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる３１種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0060] 用語「無細胞転写／翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系、in vitro翻訳系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではRNAが鋳型として用いられてタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネーター配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

[0061] ５．改変型GDHの用途

本発明の更なる局面は本酵素の用途に関する。この局面ではまず、本酵素を用いたグルコース測定法が提供される。本発明のグルコース測定法では本酵素による酸化還元反応を利用して試料中のグルコース量を測定する。この反応による変化が利用できる各種用途に本発明を適用可能である。

[0062] 本発明は例えば血糖値の測定、食品（調味料や飲料など）中のグルコース濃度の測定などに利用される。また、発酵食品（例えば食酢）又は発酵飲料（例えばビールや酒）の製造工程において発酵度を調べるために本発明を利用してもよい。

[0063] 本発明はまた、本酵素を含むグルコース測定用試薬を提供する。当該試薬は上記の本発明のグルコース測定法に使用される。グルコース測定用試薬の安定化や使用時の活性化等を目的として、血清アルブミン、タンパク質、界面活性剤、糖類、糖アルコール、無機塩類等を添加してもよい。

[0064] グルコース測定用試薬を測定キットの構成要素にすることもできる。換言すれば、本発明は、上記グルコース測定用試薬を含むキット（グルコース測定用キット）も提供する。本発明のキットは必須の構成要素として上記グルコース測定用試薬を含む。また、反応用試薬、緩衝液、グルコース標準液、容器などを任意の要素として含む。尚、本発明のグルコース測定キットには通常、使用説明書が添付される。

[0065] 本酵素を利用してグルコースセンサを構成することが可能である。即ち、本発明は、本酵素を含むグルコースセンサも提供する。本発明のグルコースセンサの典型的な構造では、絶縁性基板上に作用電極及び対極を備えた電極系が形成され、その上に本酵素とメディエータを含む試薬層が形成される。参照電極も備えた測定系を用いることにしてもよい。このような、いわゆる３電極系の測定系を用いれば、参照電極の電位を基準として作用電極の電位を表すことが可能となる。各電極の材料は特に限定されない。作用電極及び対極の電極材料の例を示せば、金（Au）、カーボン（C）、白金（Pt）、チタン（Ti）である。メディエータとしてはフェリシアン化合物（フェリシアン

化カリウムなど）、金属錯体（ルテニウム錯体、オスミウム錯体、バナジウム錯体など）、キノン化合物（ピロロキノリンキノンなど）などが使用される。尚、グルコースセンサの構成、グルコースセンサを利用した電気化学的測定法については、例えば、バイオ電気化学の実際－バイオセンサ・バイオ電池の実用展開－（２００７年３月発行、シーエムシー出版）に詳しい。

[0066] 本酵素を酵素剤の形態で提供することもできる。本発明の酵素剤は有効成分（本酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを含有していてもよい。賦形剤としてはデンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、D-グルコース、ソルビトール、D-マンニトール、白糖、グリセロール等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはエタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

実施例

[0067] 実用的価値が高いFAD-GDHの開発を目指し、以下の検討を行った。具体的には、CP変異を利用してアスペルギルス・イイズカエ由来GDH（AiGDH）の改良（特に、キシロース反応性の低下）を目指した。

[0068] （１）CP変異酵素のリンカー配列の検討

アスペルギルス・イイズカエ No.5453株由来GDHの野生型遺伝子配列（配列番号３）を元にPCR法でクローニングした遺伝子をサッカロマイセス・セレビシエ発現系pYES2プラスミドに挿入し、酵母発現用のプラスミドを構築した。次に、アスペルギルス・イイズカエ No.5453株由来GDHのアミノ酸配列（配列番号１）からホモロジーモデリングを行い、立体構造を予測した。この際、既知のアスペルギルス・フラバス由来FAD-GDHの立体構造（Yoshida, H., et al. (2015). Sci Rep 5: 13498）を元にした。CP変異酵素を作成するために

は、野生型酵素のN末端（又はその近傍）とC末端（又はその近傍）を人工的なリンカー配列で連結する必要がある。そこで、モデリングした立体構造からN末端領域とC末端領域の距離を予測した。27番アミノ酸（Y）と591番アミノ酸（V）が最短距離（約13.5Å）となった。そこで、シグナルペプチド（MLGKLTFFSALSLAVA：配列番号１４）と2アミノ酸（AP）（アミノ酸番号1～18）はそのまま残して、アミノ酸番号19～26のペプチドを除去することにした。

[0069] 次に、N末端領域とC末端領域を連結するリンカー配列を検討した。モデリングした立体構造から、新規N末端を作成可能な領域を予測した。立体構造解析から、FAD-GDHではFAD周辺が酵素活性に重要な領域であることが知られている（Yoshida, H., et al. (2015). Sci Rep 5: 13498）。そこで、FAD周辺のアミノ酸から距離が離れており、且つαヘリックス、βシートのような構造を形成しないアミノ酸配列に注目した。具体的には、立体構造上のループ構造にあるアミノ酸から複数の候補点を選択した。更に、候補点の中から、3点のアミノ酸（62番バリン（V）、184番ロイシン（L）、502番プロリン（P））を選ぶとともに、長さの異なる4種類のリンカー配列（3アミノ酸長、4アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長）を作成した。例えば、184番アミノ酸を新規N末端にした場合は、シグナルペプチド － AiGDH（アミノ酸番号184～591） － リンカー配列 － AiGDH（アミノ酸番号27～183）という変異酵素となる。作成した変異酵素発現用のプラスミドでサッカロマイセス・セレビシエINVsc1を形質転換した後、発現誘導用のガラクトースを含む液体培地で形質転換体を培養し、変異酵素を含む培養液を取得した。

[0070] グルコースに対する酵素活性を指標にスクリーニングを行った。GDHは、電子受容体存在下でグルコースの水酸基を酸化してグルコノ－δ－ラクトンを生成する反応を触媒する。GDH活性の検出は、下記の反応系で行った。

[数1]

（1）D-グルコース + 1-Methoxy PMS → D-グルコノ-δ-ラクトン + 還元型 1-Methoxy PMS

（2）2 還元型 1-Methoxy PMS + NTB → 2 1-Methoxy PMS + Diformazan

尚、式中の1-Methoxy PMSは1-Methoxy phenazine methosulfateを表し、NT

BはNitrotetrazorium blueを表す。

[0071] 反応（１）において、グルコースの酸化に伴って還元型1-Methoxy PMSが生成し、更に反応（２）において還元型1-Methoxy PMSによるNTBの還元により生成したDiformazanを570nmの波長で測定する。

[0072] 酵素活性は、以下の計算式によって算出される。

[数2]

$$\text{酵素活性（U／mL）} = \frac{\Delta OD/\min(\Delta OD_{test} - \Delta OD_{blank}) \times Vt \times df}{20.1 \times 1.0 \times Vs}$$

尚、式中のVtは総液量を、Vsはサンプル量を、20.1はDiformazanの0.5μ molあたりの吸光度係数（cm^2 / 0.5μ mol）を、1.0は光路長（cm）を、dfは希釈倍数をそれぞれ表す。

[0073] 0.1% Triton X-100を含む100 mmol/L PIPES-NaOH pH 7.0 24 mL、1 mol/L 基質溶液 3 mL、3 mmol/L 1-Methoxy PMS溶液 2 mL、6.6 mmol/L NTB溶液 1 mLを混合し、アッセイ用試薬を調製した。各基質を含むアッセイ用試薬1 mL対して培養サンプルを添加し、37℃で反応させた後、吸光度（570 nm）を測定した。

[0074] 上記の酵素活性測定法で各変異酵素を評価した。184番ロイシン（L）を新規N末端にした変異酵素（CP-L184）を評価した結果、6アミノ酸以上の長さのリンカーを導入した場合は活性を示すCP変異酵素が得られた（表１）。一方、62番バリン（V）又は502番プロリン（P）を新規N末端にしたCP変異酵素では、4種類のリンカーのいずれを用いても活性は検出限界以下であった。

[0075] 次に、CP-L184について、リンカーを長くした場合の活性を測定した。その結果、アミノ酸数が6～18のリンカーで酵素活性が検出できた（表１）。以降の検討には、17アミノ酸長のリンカー（ESSSGTSSSSGTSESSS：配列番号２３）を用いた。

[0076] リンカー配列の検討（CP-L184）

[表1]

アミノ酸数	配列	活性の有無
3	-GTS-	無
4	-GTSS-（配列番号１５）	無
6	-GTSSSS-（配列番号１６）	有
7	-GTEESSS-（配列番号１７）	有
9	-SSSGTSSSS-（配列番号１８）	有
10	-GTSQPESSS-（配列番号１９）	有
11	-GTSWAQPESSS-（配列番号２０）	有
13	-GTSAPWAQPESSS-（配列番号２１）	有
14	-YLTDTSPTEFESSS-（配列番号２２）	有
17	-ESSSGTSSSSGTSESSS-（配列番号２３）	有
18	-YVKGSDKNVKPVKGESSS-（配列番号２４）	有

[0077] （２）CP変異酵素のスクリーニング

シグナルペプチド － AiGDH（アミノ酸番号27～591） － リンカー配列 － AiGDH（アミノ酸番号27～591）の構造（アミノ酸配列）をコードするテンプレートDNAを作成した。新しく作成するN末端とC末端の位置に対応するようにPCRプライマーを設計した。まず、１次スクリーニング用として、4アミノ酸ずつN末端とC末端の位置をずらしながら、AiGDHを網羅的にカバーできる合計278本のプライマーを作成した。2つのプライマーを組み合わせてPCRを行い、増幅したDNA断片をシグナルペプチド配列を含むプラスミドに組み込むことにより、N末端とC末端の位置を変えたCP変異酵素の発現プラスミドを合計139種類作成した（図１）。これらの変異酵素発現用のプラスミドライブラリーでサッカロマイセス・セレビシエINVsc1を形質転換し、網羅的な変異酵素ライブラリーを作成した。発現誘導用のガラクトースを含む液体培地で各形質転換体を培養し、変異酵素を含む培養液を取得した。グルコースの水酸基を酸化する反応について、還元型1-Methoxy PMSを電子受容メディエータとして、NTBの還元により生成するDiformazanを570nmの波長で測定した。１次スクリーニングでは、グルコースに対する酵素活性を指標に有効な変異点を特定した。１次スクリーニングで活性があった変異点については、その前後で1アミノ酸ずつN末端とC末端の位置をずらすことでサブライブラリーを作成した。

上記の酵素活性測定法でサブライブラリーを評価した結果、グルコースに対して活性を示す、16種類のCP変異酵素が得られた（表２）。

[0078] スクリーニングによって得られたCP変異酵素

[表2]

名前	新規N末端	新規C末端
CP-L184	L184	K183
CP-E185	E185	L184
CP-S186	S186	E185
CP-N187	N187	S186
CP-S188	S188	N187
CP-Y228	Y228	E227
CP-V229	V229	Y228
CP-K354	K354	G353
CP-P355	P355	K354
CP-V356	V356	P355
CP-S357	S357	V356
CP-A425	A425	Y424
CP-A426	A426	A425
CP-D427	D427	A426
CP-K428	K428	D427
CP-T429	T429	K428

[0079] （３）CP変異酵素の組換え発現と酵素の精製

サッカロマイセス・セレビシエ発現系では活性評価に使用する培養液の酵素活性が低く、CP変異酵素の詳細な評価が困難であった。そこで、タカアミラーゼ改変CS3プロモーターとアスペルギルス・オリゼ由来FAD-GDHのターミネーター遺伝子の間につながれた発現カセットにCP変異酵素遺伝子を挿入することにした。このプラスミドではアスペルギルス・オリゼ由来オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(pyrG遺伝子)がpUC19に挿入されている。アスペルギルス・オリゼRIB40株のpyrG遺伝子欠損株を形質転換し、ウリジン

要求性を利用して形質転換株を取得した。得られた形質転換株を、可溶性でんぷんをC源にタカアミラーゼ誘導条件で液体培養し、CP変異酵素を含む培養液を取得した。

[0080] 培養液を回収してフィルター濾過と滅菌を行った後、更に疎水性カラムで精製した。精製条件を以下に示す。

精製カラム: HiTrap Phenyl FF (1 ml)

結合バッファー： 50 mM リン酸バッファー, 2 M 硫酸アンモニウム (pH 6.0)

溶出バッファー：50 mM リン酸バッファー (pH 6.0)

[0081] AKTAプライムを用い、溶出バッファーの濃度をグラジエントで上げていき、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。その結果、素通りフラクションには酵素活性はなく、最初のピークに酵素活性が濃縮することが分かった。活性のあるピークを全て回収し、限外濾過によって濃縮した。以上の方法で精製濃縮した各CP変異酵素と、同様の方法で調製した野生型酵素を用い、以下の評価を行った。

[0082] （４）CP変異酵素の基質特異性の評価

アスペルギルス・オリゼRIB40株で発現させたCP変異酵素について基質特異性を評価した。方法は、（１）と同様に、グルコースまたはその他の糖類の水酸基を酸化する反応について、還元型1-Methoxy PMSを電子受容メディエータとして、NTBの還元により生成するDiformazanを570nmの波長で測定した。基質溶液には、最終濃度0.1Mのグルコース、マルトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、2-デオキシ-D-グルコースを用いた。

[0083] 各CP変異酵素について、グルコースに対する比活性とキシロースに対する比活性を評価したところ、CP-L184（成熟体のアミノ酸配列及び遺伝子配列をそれぞれ配列番号８及び配列番号１０に示す）とCP-V229（成熟体のアミノ酸配列及び遺伝子配列をそれぞれ配列番号９及び配列番号１２に示す）がキシロース反応性の低下を示した。

[0084] グルコースに対する酵素活性を100%として、他の糖類に対する活性を相対

値で評価した。その結果、CP-L184とCP-V229は、キシロースに加えてマンノースの反応性低下を示した（表４）。また、マルトース、ガラクトース、２－デオキシ－D－グルコースの反応性は野生型と同等又は野生型よりも低かった（表３）。この結果は、これら2つのCP変異酵素の基質特異性が野生型よりも優れていることを示している。

[0085] CP変異酵素の基質特異性

[表3]

	野生型	CP-L184	CP-V229
グルコース	100%	100%	100%
キシロース	9.1%	7.5%	4.3%
マンノース	4.2%	2.5%	1.7%
マルトース	0.9%	0.6%	0.5%
ガラクトース	1.7%	1.0%	0.9%
２－デオキシ－D－グルコース	59.1%	46.9%	54.7%

[0086] （５）CP変異酵素の低温反応性評価

優れた基質特異性を示したCP変異酵素（CP-L184とCP-V229）について低温反応性を検証した。グルコースに対する酵素活性について、50℃の活性を100%にして、反応温度を変えながら相対活性を評価した。その結果、野生型の酵素と比較して、CP変異酵素CP-L184とCP-V229は、15℃から35℃の相対活性が向上していることが示唆された（図２）。この結果は、CP-L184とCP-V229は低温反応性も向上しており、血糖測定用のグルコースセンサとしてより優れた性質を持っていることを示している。

[0087] （６）リンカーの検討

キシロース反応性の低下が見られたCP-L184及びCP-V229の発現ベクターを改変して、リンカーの長さを変えた発現ベクターを構築した。まず最短のリンカーとして5アミノ酸リンカーを導入したCP変異酵素を作製した。評価を容

易にすべく、アミノ酸組成はグリシン（G）、セリン（S）及びスレオニン（T）だけとし、6アミノ酸のものと9アミノ酸のものを作製した。最後に、リンカーをより長くして、上記の検討で用いた17アミノ酸に4アミノ酸を加えた21アミノ酸のリンカーを設計した（表４）。出芽酵母での発現用に、リンカーを変えたCP-L184とCP-V229のプラスミドを構築した。出芽酵母INVsc1に形質転換した後、形質転換体を取得し、ガラクトースを含む培地で培養を行い、培養ブロスを回収して酵素活性を評価した。

[0088] リンカーの配列

[表4]

アミノ酸数	配列
5	-GTSSS-（配列番号２５）
6	-GTSSSS-（配列番号１６）
9	-GTSSSSGTS-（配列番号２６）
17	-ESSSGTSSSSGTSESSS-（配列番号２３）
21	-GTSSESSSGTSSSSGTSESSS-（配列番号２７）

[0089] 野生型酵素とCP-L184及びCP-V229のキシロース反応性を比較した。リンカーの長さが5、6、9、17、21アミノ酸と変えたCO変異酵素を比較すると、キシロース反応性は、野生型の11.4%に対してCP-L184で5.1～5.7%、CP-V229で3.5-4.4%となった（表５）。すなわち、リンカーのアミノ酸数、アミノ酸組成に関係なく、いずれのリンカーを用いても野生型よりも低いキシロース反応性を示した。このことから、リンカーの長さ及び組成は基本的に基質特異性に影響がないと結論付けた。

[0090] リンカーのアミノ酸数を変えたCP変異酵素の基質特異性

[表5]

	グルコース (%)	キシロース (%)	アミノ酸配列
野生型	100	11.4	配列番号１
CP-L184 / 5 アミノ酸	100	5.4	配列番号２８
CP-L184 / 6 アミノ酸	100	5.7	配列番号２９
CP-L184 / 9 アミノ酸	100	5.5	配列番号３０
CP-L184 / 17 アミノ酸	100	5.1	配列番号８
CP-L184 / 21 アミノ酸	100	5.5	配列番号３１
CP-V229 / 5 アミノ酸	100	4.4	配列番号３２
CP- V229 / 6 アミノ酸	100	3.5	配列番号３３
CP- V229 / 9 アミノ酸	100	3.7	配列番号３４
CP- V229 / 17 アミノ酸	100	3.5	配列番号９
CP- V229 / 21 アミノ酸	100	3.5	配列番号３５

[0091] （７）耐熱性の検討

CP変異設計の特徴として、アミノ酸置換変異と組み合わせることができる。そこで、アミノ酸置換変異をCP変異酵素に導入して耐熱性の向上を試みた。まずは野生型酵素の立体構造情報を元にして変異点を設計した。尚、アミノ酸変異導入によるFAD-GDHの耐熱性向上について複数の特許が出願・公開されている（例えば、特許第５８７３７９６号、特許第４３４８５６３号、ＷＯ　２０１５／０９９１１２　Ａ１）。

[0092] 立体構造で距離の近いセリン（S）をシステイン（C）に置換する変異を設計した。導入したシステイン同士でジスルフィド結合を形成する事で、タンパク質の構造安定化が期待できる。以下の8種類の変異酵素を作製した。

（i）S46C/S243C、（ii）S165C/S205C、（iii）S186C/S351C、（iv）S188C/S351C、（v）S308C/S322C、（vi）S436C/S471C、（vii）S482C/S489C、（viii）P417C/C566

[0093] 次に、立体構造が公開されているアスペルギルス・ニガー由来グルコースオキシダーゼ（GO）またはエリンギ由来アルコールオキシダーゼ（AAO）の構造を参考にして、アミノ酸を置換した変異酵素を設計した。GOのジスルフィド結合を模倣して、（ix）Y170C/G210Cを設計した。また、AAOのジスルフィド結合を模倣して、（x）G273C/G287Cを設計した。

[0094] 上記の10種類の変異点を設計して、PCRとin-fusion反応により野生型遺伝

子にアミノ酸変異を導入した。プラスミドの構築、出芽酵母への形質転換、組み換え発現を行った。酵素サンプルを作製し、サーマルサイクラーを用い、30℃から80℃で30分間加熱した。加温後のサンプルを37℃で活性測定して、50%失活温度（T50値）を計測した。その結果、野生型酵素と比較して、(iii) S186C/S351Cと(ix) Y170C/G210Cで耐熱性の向上が見られた（表６）。

[0095] アミノ酸置換酵素（野生型酵素に変異を導入）の温度安定性評価

[表6]

変異点	T50 （℃）*
野生型	---
S46C/S243C	+ 0.03
S165C/S205C	- 8.37
S186C/S351C	**+ 4.03**
S188C/S351C	- 2.46
S308C/S322C	活性無し
S436C/S471C	- 0.76
S482C/S489C	+ 0.23
P417C/C566	- 4.88
Y170C/G210C	**+ 20.7**
G273C/G287C	活性無し

＊野生型のT50値を基準として表記

[0096] 次に、耐熱性が向上した変異点であるS186C/S351CとY170C/G210CをCP-V229に導入した。PCRとin-fusion反応によりCP-V229-5aa（アミノ酸配列及び遺伝子配列をそれぞれ配列番号３２及び配列番号３８に示す）にアミノ酸変異を導入した。プラスミドの構築、出芽酵母への形質転換、組み換え発現を行った。酵素サンプルを作製し、サーマルサイクラーを用い、30℃から80℃で30分間加熱した。加温したサンプルを37℃で活性測定する事で、50%失活温度（

T50値）を計測した。その結果、いずれの変異についても、変異導入前（CP-V229-5aa）と比較して、変異導入後（CP-V229-5aa（S186C/S351C)、CP-V229-5aa（Y170C/G210C））で大幅な耐熱性の向上が見られた（表７）。尚、CP-V229-5aa（S186C/S351C)のアミノ酸配列及び遺伝子配列をそれぞれ配列番号３６及び配列番号４０に示し、CP-V229-5aa（Y170C/G210C)のアミノ酸配列及び遺伝子配列をそれぞれ配列番号３７及び配列番号４２に示す。

[0097] アミノ酸置換酵素（CP-V229に変異を導入）の温度安定性評価

[表7]

変異点	T50 （℃）*	アミノ酸配列
CP-V229-5aa	---	配列番号３２
CP-V229-5aa (S186C/S351C)	+ 7.50	配列番号３６
CP-V229-5aa (Y170C/G210C)	+ 19.1	配列番号３７

＊CP-V229のT50値を基準として表記

[0098] さらに、キシロース反応性の評価を行った。野生型酵素、変異導入前のCP変異酵素及び変異導入後のCP変異酵素でキシロース反応性を比較したところ、野生型の11.4%に対して、変異導入後のCP変異酵素（CP-V229-5aa（S186C/S351C)、CP-V229-5aa（Y170C/G210C））は5.4％（CP-V229-5aa（S186C/S351C））及び5.8%（CP-V229-5aa（Y170C/G210C））となった（表８）。即ち、野生型に比較して、変異導入後のCP変異酵素のキシロース反応性はいずれも低く、変異導入前のCP変異酵素（CP-V229-5aa）と同じレベルのキシロース反応性を示した。このように、耐熱性向上に有効な変異の導入後もキシロース反応性が低い性質は維持されていた。

[0099] アミノ酸置換導入CP変異酵素の基質特異性

[表8]

	グルコース (%)	キシロース (%)	アミノ酸配列
野生型	100	11.4	配列番号１
CP-V229-5aa	100	4.4	配列番号３２
CP-V229-5aa (S186C/S351C)	100	5.4	配列番号３６
CP-V229-5aa (Y170C/G210C)	100	5.8	配列番号３７

[0100] 以上の通り、CP変異酵素の耐熱性の向上に成功した。耐熱性が向上したCP変異酵素はキシロース反応性も低く、血糖測定用酵素として極めて有用である。

産業上の利用可能性

[0101] 本発明のGDHは基質特異性（特にキシロースに対する反応性）が改善されており、特にグルコースセンサへの利用に適したものである。本発明によれば低温反応性の改善も図ることができる。低温反応性が改善されたGDHは低温環境下での利用が想定される用途（典型的には血糖測定器用のグルコースセンサ）に適する。

[0102] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

配列表フリーテキスト

[0103] 配列番号４：人工配列の説明：変異酵素CP-L184のN末端側配列

配列番号５：人工配列の説明：変異酵素CP-L184のC末端側配列

配列番号６：人工配列の説明：変異酵素CP-V229のN末端側配列

配列番号７：人工配列の説明：変異酵素CP-V229のC末端側配列

配列番号８：人工配列の説明：変異酵素CP-L184

配列番号９：人工配列の説明：変異酵素CP-V229

配列番号１０：人工配列の説明：変異酵素CP-L184遺伝子

配列番号１１：人工配列の説明：変異酵素CP-L184遺伝子

配列番号１２：人工配列の説明：変異酵素CP-V229遺伝子

配列番号１３：人工配列の説明：変異酵素CP-V229遺伝子

配列番号１４：人工配列の説明：シグナルペプチド

配列番号１５：人工配列の説明：リンカー

配列番号１６：人工配列の説明：リンカー

配列番号１７：人工配列の説明：リンカー

配列番号１８：人工配列の説明：リンカー

配列番号１９：人工配列の説明：リンカー

配列番号２０：人工配列の説明：リンカー

配列番号２１：人工配列の説明：リンカー

配列番号２２：人工配列の説明：リンカー

配列番号２３：人工配列の説明：リンカー

配列番号２４：人工配列の説明：リンカー

配列番号２５：人工配列の説明：リンカー

配列番号２６：人工配列の説明：リンカー

配列番号２７：人工配列の説明：リンカー

配列番号２８：人工配列の説明：変異酵素CP-L184-5aa

配列番号２９：人工配列の説明：変異酵素CP-L184-6aa

配列番号３０：人工配列の説明：変異酵素CP-L184-9aa

配列番号３１：人工配列の説明：変異酵素CP-L184-21aa

配列番号３２：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa

配列番号３３：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-6aa

配列番号３４：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-9aa

配列番号３５：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-21aa

配列番号３６：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (S186C/S351C)

配列番号３７：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (Y170C/G210C)

配列番号３８：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa遺伝子

配列番号３９：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa遺伝子

配列番号４０：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (S186C/S351C)遺伝子

配列番号４１：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (S186C/S351C)遺伝子

配列番号４２：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (Y170C/G210C)遺

伝子

配列番号４３：人工配列の説明：変異酵素CP-V229-5aa (Y170C/G210C)遺伝子

請求の範囲

[請求項1] 配列番号４のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第１配列と、配列番号５のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第２配列がペプチドリンカーを介して連結した一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第３配列と、配列番号７のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列からなる第４配列がペプチドリンカーを介して連結した一次構造を有し、配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型酵素に比較して、D-キシロースに対する反応性が低い、及び／又はグルコースデヒドロゲナーゼ活性の低温反応性が向上している、グルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項2] 前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が80%以上である、請求項１に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項3] 前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が85%以上である、請求項１に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項4] 前記第１配列、前記第２配列、前記第３配列及び前記第４配列を規定する同一性が90%以上である、請求項１に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項5] 配列番号４のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列と、配列番号５のアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造を有する、請求項１に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項6] 配列番号６のアミノ酸配列の125番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列の160番セリンがシステインに置換されたアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造、又は配列番号６のアミノ酸配列と、配列番号７のアミノ酸配列の144番チロシンがシステインに置換され、且つ184番グリシンがシステインに置換されたたアミノ酸配列がペプチドリンカーを介して連結された一次構造を有する、請求項１に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項7] 前記ペプチドリンカーを構成するアミノ酸の数が５～３０である、請求項１～６のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項8] 前記ペプチドリンカーがESSSGTSSSSGTSESSS（配列番号２３）又はGTSSS（配列番号２５）である、請求項７に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項9] (a)配列番号８のアミノ酸配列、

(b)配列番号８のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

(c)配列番号９のアミノ酸配列、

(d)配列番号９のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

(e)配列番号３２のアミノ酸配列、又は

(f)配列番号３２のアミノ酸配列との同一性が70%以上のアミノ酸配列、

を有し、配列番号１のアミノ酸配列からなる野生型酵素に比較して、D-キシロースに対する反応性が低い、及び／又はグルコースデヒドロゲナーゼ活性の低温安定性が向上している、グルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項10] (b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が80%以上である、請求項９に記載のグルコースデヒ

ドロゲナーゼ。

[請求項11] (b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が85%以上である、請求項９に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項12] (b)のアミノ酸配列、(d)のアミノ酸配列及び(f)のアミノ酸配列を規定する同一性が90%以上である、請求項９に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項13] 配列番号８のアミノ酸配列の173番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列、又は配列番号９のアミノ酸配列の128番リジンがバリン、イソロイシン、プロリン又はグルタミンに置換されたアミノ酸配列からなる、請求項９に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項14] 配列番号３６又は３７のアミノ酸配列からなる、請求項９に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項15] D-グルコースに対する反応性を100％としたときのD-キシロースに対する反応性が8％以下である、請求項１～１４のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ。

[請求項16] 請求項１～１５のいずれかのグルコースデヒドロゲナーゼをコードするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

[請求項17] 以下の(A)～(C)からなる群より選択されるいずれかのDNAからなる、請求項１４に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子：

(A)配列番号８、９、３２、３６又は３７のアミノ酸配列をコードするDNA；

(B)配列番号１０～１３、３８～４３のいずれかの塩基配列からなるDNA；

(C)配列番号１０～１３、３８～４３のいずれかの塩基配列と等価な塩基配列を有し、且つグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[請求項18] 請求項１６又は１７に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換えDNA。

[請求項19] 請求項１８に記載の組換えDNAを保有する微生物。

[請求項20] 以下のステップ(1)～(3)を含む、グルコースデヒドロゲナーゼの調製法：

(1)請求項１６又は１７に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を用意するステップ；

(2)前記遺伝子を発現させるステップ；及び

(3)発現産物を回収するステップ。

[請求項21] 請求項１～１５のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを用いて試料中のグルコースを測定することを特徴とする、グルコース測定法。

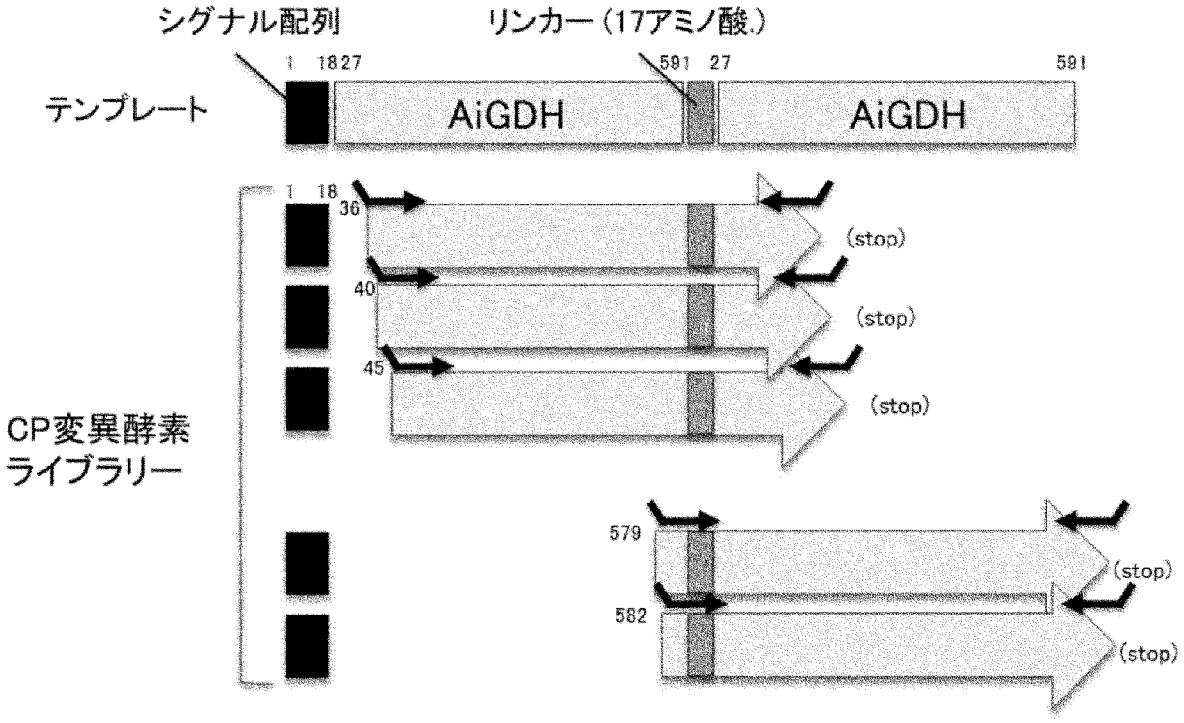
[請求項22] 請求項１～１５のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコース測定用試薬。

[請求項23] 請求項２２に記載のグルコース測定用試薬を含む、グルコース測定用キット。

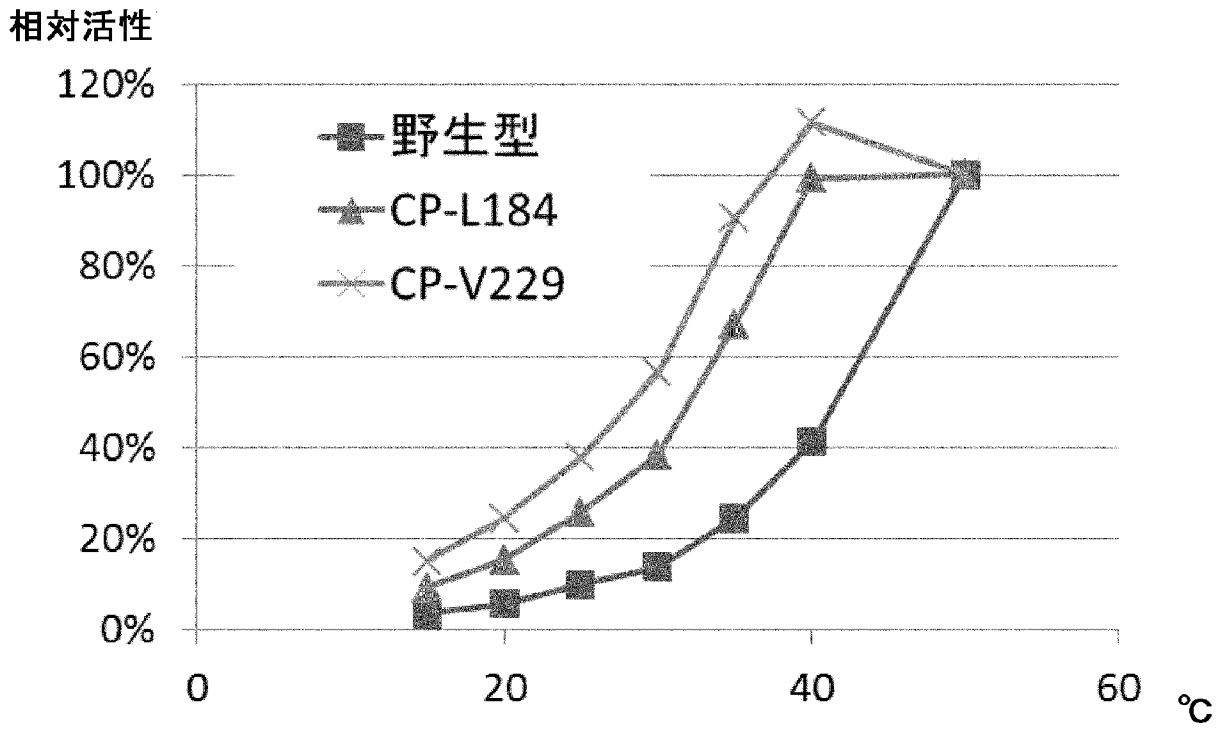
[請求項24] 請求項１～１５のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含む、グルコースセンサ。

[請求項25] 請求項１～１５のいずれか一項に記載のグルコースデヒドロゲナーゼを含有する酵素剤。

[図1]


シグナル配列
リンカー（17アミノ酸）
テンプレート
1
18
27
591
27
591
AiGDH
AiGDH
CP変異酵素
ライブラリー
1
18
36
40
45
(stop)
(stop)
(stop)
579
582
(stop)
(stop)

[図2]


相対活性
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
野生型
CP-L184
CP-V229
0
20
40
60
℃

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/020777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/53(2006.01)i, C12M1/40(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C07K5/10(2006.01)n, C07K7/06(2006.01)n, C07K7/08(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/53, C12M1/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09, C12N15/52, C12N15/63, C12Q1/32, C07K5/10, C07K7/06, C07K7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/062103 A1 (AMANO ENZYME INC.) 05 April 2018, claims 5, 9-13, SEQ ID NO: 1, 21-28, examples (Family: none)	1-4,7,9-13, 16-25
Y		1-4,7-13,15-25
Y	JP 2008-529530 A (EMORY UNIVERSITY) 07 August 2008, claim 1, paragraph [0077], fig. 1B & US 2008/0003619 A1, claim 1, paragraph [0092], fig. 1B & WO 2006/086607 A2 & EP 1851324 A1	1-4,7-13,15-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 August 2019 (05.08.2019)	13 August 2019 (13.08.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/020777

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUNTAS, G. et al., "Circular Permutation in the omega-Loop of TEM-1 beta-Lactamase Results in improved Activity and Altered Substrate Specificy", PLoS ONE, 2012, vol. 7, no. 4, e35998, pp. 1-5, abstract, fig. 2	1-4,7-13,15-25
Y	DAUGHERTY, A. B. et al., "Improved Biocatalysists from a Synthetic Circular Permutation Library of the Flavin-Dependent Oxidoreductase Old Yellow Enzyme", J Am Chem Soc, 2013, vol. 135, pp. 14425-14432, abstract, table 1, fig. 1	1-4,7-13,15-25
Y	DAUGHERTY, A. B. et al., "Structural and Functional Consequences of Circular Permutation on the Active Site of Old Yellow Enzyme", ACS Catal, 2015, vol. 5, pp. 892-899, abstract, page 892, right column, lines 9-12, page 894, left column, paragraph [0002] to right column, paragraph [0003]	1-4,7-13,15-25
Y	JP 2012-29677 A (TOYOBO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 16 February 2012, paragraph [0029] (Family: none)	1-4,7-13,15-25
Y	WO 2007/116710 A1 (TOYOBO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 18 October 2007, claims 20-22, abstract & US 2008/0003628 A1, claims 20-22, abstract & JP 2007-289148 A & EP 2003199 A1 & CN 101454449 A	1-4,7-13,15-25
A	WO 2017/077924 A1 (AMANO ENZYME INC.) 11 May 2017, SEQ ID NO: 1 & US 2019/0153401 A1 & EP 3372678 A1 & CN 108350438 A	1-25

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０２０７７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/53(2006.01)i, C12M1/40(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i, C07K5/10(2006.01)n, C07K7/06(2006.01)n, C07K7/08(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/53, C12M1/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09, C12N15/52, C12N15/63, C12Q1/32, C07K5/10, C07K7/06, C07K7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2018/062103 A1 (天野エンザイム株式会社) 2018.04.05, 請求項 5,9-13,配列番号 1,21-28,実施例	1-4,7,9-13, 16-25
Y	(ファミリーなし)	1-4,7-13,15-25
Y	JP 2008-529530 A (エモリー・ユニバーシティ) 2008.08.07, 請求項 1,[0077],図 1B & US 2008/0003619 A1,Claim 1,[0092],FIG.1B & WO 2006/086607 A2 & EP 1851324 A1	1-4,7-13,15-25

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０５．０８．２０１９	１３．０８．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３６４４
伊藤　良子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	GUNTAS G et al., Circular Permutation in the omega-Loop of TEM-1 beta-Lactamase Results in improved Activity and Altered Substrate Specificy, PLoS ONE, 2012, Vol.7, No.4 e35998, p.1-5, 要約,Figure 2	1-4,7-13,15-25
Y	DAUGHERTY A B et al., Improved Biocatalysists from a Synthetic Circular Permutation Library of the Flavin-Dependent Oxidoreductase Old Yellow Enzyme, J Am Chem Soc, 2013, Vol.135, p.14425-14432, 要約,Table 1,Figure 1	1-4,7-13,15-25
Y	DAUGHERTY A B et al., Structural and Functional Consequences of Circular Permutation on the Active Site of Old Yellow Enzyme, ACS Catal, 2015, Vol.5, p.892-899, 要約,第892頁右欄第9行～第12行,第894頁左欄第2段落～右欄第3段落	1-4,7-13,15-25
Y	JP 2012-29677 A（東洋紡績株式会社）2012.02.16, [0029]（ファミリーなし）	1-4,7-13,15-25
Y	WO 2007/116710 A1（東洋紡績株式会社）2007.10.18, 請求項20-22, 要約 & US 2008/0003628 A1,Claims 20-22,Abstract & JP 2007-289148 A & EP 2003199 A1 & CN 101454449 A	1-4,7-13,15-25
A	WO 2017/077924 A1（天野エンザイム株式会社）2017.05.11, 配列番号1 & US 2019/0153401 A1 & EP 3372678 A1 & CN 108350438 A	1-25